

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

**Defective images within this document are accurate representation of
The original documents submitted by the applicant.**

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORLED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

21 Offenlegungsschrift
10 DE 196 43 921 A 1

21 Aktenzeichen: 196 43 921.3
22 Anmeldetag: 30. 10. 96
43 Offenlegungstag: 7. 5. 97

61 Int. Cl.⁸:
G 01 N 27/62
G 01 N 1/28
C 12 Q 1/68

DE 196 43 921 A 1

30 Unionspriorität: 32 33 31

01.11.95 US 551501

71 Anmelder:

Hewlett-Packard Co., Palo Alto, Calif., US

74 Vertreter:

Schoppe, F., Dipl.-Ing.Univ., Pat.-Anw., 81479
München

72 Erfinder:

Hancock, William S., Hillsborough, Calif., US;
Chakel, John A., San Mateo, Calif., US; Apffel,
James A., Palo Alto, Calif., US; Lichtenwalter, Kay,
San Jose, Calif., US

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Integriertes Nukleinsäureanalyzesystem für eine Matrix-unterstützte
Laser-Desorption/Ionisation-Laufzeit-Massenspektroskopie

57 Ein integriertes Nukleinsäureprobenanalyzesystem für eine
Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation-Laufzeit-
Massenspektroskopie (MALDI-TOF-MS) umfaßt ein miniaturisiertes
Probenvorbereitungsfach, das direkt mit einer MALDI-TOF-Ionisations-
oberfläche zum Verstärken und/oder andersartigen chemischen
Manipulieren eines Oligonukleotid-Analyts und zum Überreichen des
Analyts zu einer MALDI-Ionisationsoberfläche für eine Massenspektrometrie-
analyse schnittstellenmäßig verbunden ist. Das miniaturisierte
integrierte Probenhandhabungssystem wird bei der Verstärkung und
Analyse von DNS-Proben für eine genetische Diagnose und andere
Anwendungen verwendet.

DE 196 43 921 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung bezieht sich allgemein auf die Probenvorbereitung für die Massenspektroskopie. Insbesondere bezieht sich die Erfindung auf ein miniaturisiertes integriertes Handhabungsgerät für Nukleinsäureproben, die direkt mit einer MALDI-TOF-Ionisationsoberfläche (MALDI-TOF = Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation-Laufzeit) schnittstellenmäßig verbunden sind. Das hierin offenbarte integrierte System findet Verwendung bei der Verstärkung und Analyse von DNS-Proben für eine genetische Diagnose und bei anderen klinischen oder forensischen Zwecken.

Die Verwendung der DNS-Analyse bei der Diagnose und der Handhabung von menschlichen Krankheiten erhält weit verbreitete Aufmerksamkeit in Gebieten, wie z. B. der Infektionskrankheitsdiagnose, der DNS-Typisierung und -Transplantation, der Diagnose und Handhabung von Krebs und bei der Diagnose und Reihenuntersuchung von genetischen Krankheiten. Siehe beispielsweise in K.J. Skogerboe, "Molecular Biology Techniques", Anal. Chem. 67, 449R-454R (1995).

Die Fähigkeit, genetisch normale oder abweichende Gensequenzen in klinischen Proben zu erfassen, erfordert im allgemeinen die Verwendung einer enzymatischen Oligonukleotid-Verstärkungstechnik (z. B. der Polymerase-Kettenreaktion (PCR; PCR Polymerase Chain Reaction)), um erfaßbare Pegel von ausgewählten Regionen einer DNS zur Analyse zu erzeugen. Eine Sequenzanalyse erfordert zusätzliche enzymatische oder chemische Verarbeitungsschritte.

Die genetische Analyse einer menschlichen Krankheit betrifft eine groß angelegte Erfassung und Reihenuntersuchung von klinischen DNS-Proben. Gegenwärtige Verfahren zur DNS-Analyse verwenden herkömmliche thermische PCR-Durchlaufgeräte und mehrere Geräte zum Vorbereiten, zum Trennen und zum Erfassen der DNS. Die Probenvorbereitung wird mit herkömmlichen Probenhandhabungsgeräten (Teströhrchen, Pipetteneinrichtungen, Mikrozentrifugen, Konzentriereinrichtungen, Filtergeräten) ausgeführt, wobei dieselbe viele manuelle Handhabungsschritte und Übertragungen umfaßt. Solche Prozeduren sind laborintensiv, zeitaufwendig, teuer und anfällig für eine Probenverschmutzung und einen Probenverlust.

Die groß angelegte Erfassung und Reihenuntersuchung von klinischen DNS-Proben erfordert automatisierbare, schnelle und kosteneffektive Techniken zur Probenverarbeitung und zur Messung. Diese Techniken müssen empfindlich, genau und reproduzierbar sein.

Die Laufzeit-Massenspektrometrie (TOF-MS; TOF-MS = Time-Of-Flight Mass Spectrometry) ist eine solche Technik, die potentiell in der Lage ist, für eine DNS-basierte klinische Reihenuntersuchung verwendet zu werden. Die TOF-MS ist die effizienteste Massenanalysetechnik bezüglich der Erfassungsempfindlichkeit, wobei dieselbe ohne weiteres eine gute Massenanalyse mit einer guten Massengenauigkeit liefert (R.J. Cotter, Anal. Chem. 64 (21), 1027 (1992)). Dieselbe ist eine der wenigen Analysetechniken, die eine hohe Empfindlichkeit, eine hohe Selektivität und Spezifität mit einer Analysegeschwindigkeit kombiniert. Die TOF-MS kann beispielsweise ein vollständiges Massenspektrum im Mikrosekundenbereich aufzeichnen.

Die Technik der Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation (MALDI; MALDI = Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) (M. Karas und F. Hillenkamp, Anal. Chem. 60, 2299 (1988)) erweiterte den analytischen Bereich der Massenspektrometrie auf Oligonukleotide und Nukleinsäuren. Siehe allgemein in P. Limbach u. a., "Characterization of oligonucleotides and nucleic acids by mass spectrometry", In Current Opinion in Biotechnology, 6, 96-102 (1995). Die Verwendung der MALDI-TOF-MS, um Produkte einer Restriktionsenzymdigestion mit einer Länge von 9 bis 622 bp zu erfassen, mit einer Meßgenauigkeit von ± 2 bp für Fragmente kleiner als 622 wurde berichtet (Y.-H. Liu u. a., Rapid Commun. Mass Spec. 9, 735-743 (1995)). Die PCR-DNS-Fragmente von 86 bis 426 bp werden routinemäßig schneller als mit der Gelelektrophorese erfaßt (Y.-H. Liu u. a., *ibid.*). Ein 40-Basen-Oligonukleotid kann mit einer Ein-Basen-Auflösung erfaßt werden (T.A. Shaler u. a., Rapid Commun. Mass Spec. 9, 942-947 (1995)). Diese Berichte dokumentieren den schnellen Fortschritt, der in der Massenspektrometrie für die DNS-Erfassung und -Sequenzierung durchgeführt wird, und die Anwendung derselben für die klinische Genetik.

Die Probenhandhabung ist sehr wichtig für die erfolgreiche Anwendung der MALDI-TOF-MS auf die klinische Genetik. Die Probenvorbereitung für die Massenspektroskopie kann die Konzentration eines Analyts und/oder Reinigungsschritte erfordern, um Verschmutzungsstoffe zu entfernen, die andernfalls die Genauigkeit der Massenbestimmung und die Ionenströme für größere Oligonukleotide stören könnten. Die Reinigung kann entweder auf der Sonde (on-probe) oder außerhalb der Messung (off-line) durchgeführt werden. Für eine Reinigung auf der Sonde wird das Analyt in eine Sondenoberfläche absorbiert, die für eine nicht-selektive (Y.-H. Liu u. a., Rapid Commun. Mass Spectro. 9, 735-743 (1995)) oder selektive Absorption (z. B. eine Affinitätsersassungsoberfläche, siehe W.T. Hutchens, PCT-Anmeldung WO 94/28418) modifiziert ist. Eine geeignete modifizierte Sondenoberfläche kann ebenfalls für die Analytkonzentration verwendet werden. Für analytische Probleme, die mehrere biochemische Modifikationen eines Oligonukleotidanalyts vor der MS-Erfassung und Messung benötigen (z. B. PCR-Verstärkung, Restriktionsenzymdigestionen, Sequenzierungsreaktionen), ist die Auf-Sonden-Verarbeitung potentiell in der Lage insoweit verwendet zu werden, daß nur ein kleiner Anteil des Matrix-eingebetteten Analyts tatsächlich während der MALDI desorbiert wird. Diese Prozedur erhöht jedoch die Wahrscheinlichkeit einer Verschmutzung oder eines Verlusts der Probe während des wiederholten Entnehmens und Wiedereinsetzens der Sonde in die Quelle des Massenspektrometers und während des Abwaschens der Matrix vor der biochemischen Modifikation des Analyts. Die Reinigung und Konzentration des Analyts außerhalb der Analyse ist weiter verbreitet, dieselbe benötigt jedoch mehrere manuelle Übertragungen und Misch- und Konzentrationsschritte, welche arbeitsintensiv und zeitaufwendig sind und das Risiko des Probenverlusts erhöhen.

Die Knappheit an effizienten Probenvorbereitungs- und Handhabungstechniken bleibt eine ernsthafte Begrenzung für die Routineverwendung der Massenspektroskopie für die Nukleinsäureanalyse. Da Massenmes-

sungen in einem Bruchteil der Zeit, die zur Probenvorbereitung und Handhabung benötigt wird, durchgeführt werden können, ist die Probenhandhabung der Geschwindigkeitsbegrenzungsschritt bei dem analytischen Prozeß. In jüngster Zeit wurden DNS-Probenvorbereitungstechnologien erfolgreich auf miniaturisierte Formate reduziert. Siehe beispielsweise in P. Wilding u. a., Clin. Chem. 40, 1815—1818 (1994) (PCR-Microchip); A.T. Woolley und R.A. Mathies, Proc. Natl. Acad. Sci. 91, 11348—11352 (1994) (Kapillarray-Elektrophoresemikrochip); M. Eggers und D. Ehrlich, Hematol. Pathol. 9, 1—15 (1995) (mikrohergestellte Geräte für eine Gen-basierte Diagnostik). Auftretende Technologien zum Miniaturisieren von Detektorgeräten wurden ebenfalls berichtet (Cambridge Healthtech Institute Conference on Microfabrication Technology, 28.—29. September 1995, San Francisco, CA). Die Integration einer miniaturisierten Probenhandhabungseinrichtung mit einem Probenüberreichungsgerät würde die Vorteile der erhöhten Analysegeschwindigkeit, der verringerten Probengröße und des verringerten Reagenzverbrauchs, des verringerten Probenverlusts und der geringeren Verschmutzung und der erhöhten Erfassungseffizienz- und -Genauigkeit bringen.

Demgemäß besteht nach wie vor ein Bedarf nach einem integrierten Nukleinsäureanalyzesystem für die MALDI-TOF-MS, welches entworfen ist, um die inhärenten Nachteile herkömmlicher Probenhandhabungstechniken zu vermeiden, während die Vorteile der Massenspektrometrieerfassung und -Messung beibehalten werden.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein integriertes Nukleinsäureanalyzesystem für die MALDI-TOF-Massenspektroskopie zu schaffen, das ein miniaturisiertes Probenhandhabungsgerät umfaßt.

Diese Aufgabe wird durch ein integriertes Nukleinsäureanalyzesystem für die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation-Laufzeit-Massenspektroskopie gemäß Anspruch 1, 11 oder 15 gelöst.

Um den oben beschriebenen Bedarf in der Technik zu bedienen, schafft die hierin offenbarte und beanspruchte Erfindung ein integriertes Nukleinsäureanalyzesystem für die MALDI-TOF-MS auf einem Dünnschichtträger, wobei das System eine miniaturisierte Probenhandhabungseinrichtung aufweist, die mit einer MALDI-Ionisationsoberfläche zum Erfassen und Messen von Oligonukleotidanalyten in einem Laufzeit-Massenspektrometer integriert ist.

Ein Vorteil der vorliegenden Erfindung besteht darin, daß sie ein automatisierbares Gerät für eine verbesserte Probenhandhabung vor der massenspektrometrischen Analyse schafft. Ein miniaturisiertes System gemäß der vorliegenden Erfindung ist in der Lage, eine komplexe Probenhandhabung, eine Trennung und Überreichung von Oligonukleotidanalyten für die Massenspektroskopie mit einer Geschwindigkeit und Genauigkeit durchzuführen, ohne daß eine wesentliche manuelle Manipulation und Interaktion notwendig ist.

Noch ein weiterer Vorteil der vorliegenden Erfindung besteht darin, daß sie kleine Mengen einer Probe mit einem minimalen Probenverlust handhaben kann. Ein miniaturisiertes Probenvorbereitungsfach mit einer automatisierbaren Einrichtung zum Trennen, zum biochemischen Manipulieren und zum Bewegen von Oligonukleotidanalyten von Punkt zu Punkt in dem Fach reduziert die Wahrscheinlichkeit eines Probenverlusts stark.

Ein verwandter Vorteil der vorliegenden Erfindung besteht darin, daß sie die Empfindlichkeit und Selektivität einer Analytmessung erhöht, indem Einfangregionen in dem Probenhandhabungsfach zum Konzentrieren eines Oligonukleotids, welche in einer niedrigen Konzentration vorhanden sind, und zum Entfernen von potentiell störenden Molekülen und Ionen von dem Analyt vor der Massenspektrometrie geschaffen sind, wodurch das Signal verstärkt und das Rauschen in dem Massenspektrum erniedrigt wird.

Ein weiterer Vorteil der vorliegenden Erfindung besteht darin, daß sie eine Selektivität und Sensitivität zur Analytmessung schafft, indem eine Einrichtung geschaffen wird, um eine DNS-Verstärkung in einem schnellen Durchlauf mit einer oligonukleotidprobe durchzuführen, wodurch ausgewählte DNS-Regionen auf für die Massenspektrometrie erfassbare Pegel verstärkt werden.

Noch ein weiterer Vorteil der vorliegenden Erfindung besteht darin, daß dieselbe eine oder mehrere Oligonukleotid-Prozeßreaktionszonen mit immobilisierten Enzymen schafft. Die Verwendung von immobilisierten Enzymen bei der vorliegenden Erfindung ist darauf gerichtet, um eine erhöhte Enzymstabilität mit einer verbesserten Reaktionskinetik, um einen niedrigeren Verlust eines Enzyms von einer nicht-spezifischen Adsorption an Oberflächen und um eine verringerte Verschmutzung von Reaktionszonen mit unerwünschten Enzymen zu schaffen.

Noch ein weiterer verwandter Vorteil der vorliegenden Erfindung besteht darin, die Durchführung vieler gleichzeitiger oder aufeinanderfolgender Analysen in dem gleichen Experiment mit einer On-line-Überwachungsfähigkeit zu versehen. Bei einem bevorzugten Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung wird eine Mehrzahl von MALDI-Ionisationsoberflächen innerhalb der Probenvorbereitung bereitgestellt, welche während der Massenspektrometrie reversibel abgedichtet werden können. Ein alternatives bevorzugtes Ausführungsbeispiel betrifft die Platzierung der MALDI-Ionisationsoberflächen in einem drehbaren Kammergerät, welches zwischen der Funktion der Probensammlung und der Funktion der Probenüberreichung abwechselt.

Noch ein weiterer Vorteil der vorliegenden Erfindung besteht darin, die Kosten des Analysierens von oligonukleotiden durch die Massenspektroskopie durch Aufbau des Analyzesystems als eine einzige wegwerfbare Einheit zu reduzieren. Für die diagnostische Reihenuntersuchung von genetischen Proben wird das Einwegmerkmal die Kreuzverschmutzung von Proben beseitigen und falsche positive Ergebnisse reduzieren.

Bevorzugte Ausführungsbeispiele der vorliegenden Erfindung werden nachfolgend bezugnehmend auf die beiliegenden Zeichnungen detaillierter erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 eine Explosionsansicht eines Probenhandhabungssystems, das mit einer MALDI-Ionisationsoberfläche integriert ist;

Fig. 2A eine Draufsicht der oberen Oberfläche des integrierten Probenhandhabungssystems von Fig. 1;

Fig. 2B eine Draufsicht der äußeren unteren Oberfläche des integrierten Probenhandhabungssystems von Fig. 1;

Fig. 3 ein bevorzugtes Ausführungsbeispiel des integrierten Probenhandhabungssystems von Fig. 1, wobei

Fig. 3A eine Draufsicht der oberen Oberfläche ist, die einzelne Merkmale des Probenvorbereitungsfachs zeigen, während Fig. 3B eine Draufsicht der oberen Oberfläche ist, die die Platzierung der Öffnungen zeigt; und

Fig. 4 ein Kammgerät, das eine Mehrzahl von MALDI-Ionisationsoberflächen in der Handhabungseinrichtung (Fig. 4A) enthält, und ein Kammgerät, das eine Mehrzahl von Zahndochten enthält, welche MALDI-Ionisationsoberflächen mit Einfangregionen aufweisen (Fig. 4B).

Vor der detaillierten Beschreibung der Erfindung sei angemerkt, daß diese Erfindung nicht auf die speziellen Komponententeile des beschriebenen Geräts oder auf die speziellen Prozessschritte der beschriebenen Verfahren begrenzt ist, da solche Geräte und Verfahren variieren können. Es ist ebenfalls offensichtlich, daß die hierin verwendete Terminologie lediglich zur Beschreibung von speziellen Ausführungsbeispielen dient und nicht begrenzend ist. Bezüglich der Verwendung in der Beschreibung und der beigefügten Ansprüche umfassen die Singularformen "ein" und "der/die/das" mehrere Bezüge, es sei denn, daß der Kontext deutlich etwas anderes aussagt. Somit umfaßt der Verweis auf "ein Analyt" Mischungen von Analyten, der Verweis auf "eine MALDI-Ionisationsoberfläche" zwei oder mehrere solcher Ionisationsoberflächen, der Verweis auf "einen Mikrokanal" mehr als eine solche Komponente, und dergleichen.

In dieser Beschreibung und in den folgenden Ansprüchen wird auf eine Anzahl von Ausdrücken Bezug genommen, welche im nachfolgenden definiert werden.

Der Ausdruck "Dünnschichtträger" wird hierin verwendet, um auf einen im wesentlichen planaren Verteiler zu verweisen, der aus einem nicht-leitenden Material besteht, und der einen Mikrokanal und weitere notwendige Komponenten eines miniaturisierten Probenvorbereitungsfachs, eine Schnittstelle zu nicht-wegwerfbaren Teilen und eine Ionisationsoberfläche für die MALDI-TOF-MS aufweist. Ein solches miniaturisiertes Gerät kann aus einer Vielzahl von Materialien (z. B. Silizium, Glas, Niederpreispolymere) durch Techniken gebildet werden, die in der Technik bekannt sind (z. B. Mikrobearbeitung, chemisches Ätzen, Laserablation und dergleichen). Abschnitte des Geräts können aus zusammengesetzten Materialien hergestellt werden. Eine thermisch isolierte Reaktionszone kann beispielsweise aus verbundenen Schichten von Materialien mit unterschiedlichen thermischen Leitfähigkeiten gebildet sein. Es existieren bekannte Techniken zur Mikrobearbeitung planarer Materialien, wie z. B. Silizium, wobei dieselben einen nützlichen und weit verbreitet angenommenen Lösungsansatz für die Miniaturisierung schaffen. Beispiele der Verwendung solcher Mikrobearbeitungstechniken, um miniaturisierte Trenngeräte auf Silizium- oder Borsilikatglas-Chips zu erzeugen, können in dem U.S. Patent Nr. 5,194,133 an Clark u. a., in dem U.S. Patent Nr. 5,132,012 an Miura u. a., in dem U.S. Patent Nr. 4,908,112 an Pace und in dem U.S. Patent Nr. 4,891,120 an Sethi u. a. gefunden werden.

Der Ausdruck "Probenvorbereitungsfach" wird hierin verwendet, um auf eine Region des Trägers zu verweisen, in der die Probenhandhabung ausgeführt wird. Die Probenhandhabung umfaßt den gesamten Bereich von Operationen, die mit der Probe durchgeführt werden, und zwar von ihrer Einführung in das Fach bis zu ihrer Entfernung zur Analyse oder Verwendung. Solche Operationen können folgende Operationen aufweisen, sie sind jedoch nicht auf die genannten begrenzt: Konzentrieren eines Oligonukleotidanalyts aus einer schwachen Lösung (z. B. durch selektive Absorption an eine chemisch-modifizierte Oberfläche); Trennen eines Oligonukleotidanalyts von potentiell störenden Molekülen und Ionen (z. B. durch chromatographische und/oder elektro-phoretische Verfahren); Durchführen eines Ionenaustausches oder Pufferaustausches mit einem Ionennukleotidanalyt-enthaltenden Fluid; chemisches Manipulieren eines Oligonukleotidanalyts (z. B. durch Verstärkung, Nukleasedigestion, Hinzufügung oder Entfernung von Nukleotiden, kovalente Modifikationen von Nukleotiden, Oligonukleotidhybridisierung und -Denaturierung und dergleichen).

Das Probenvorbereitungsfach wird häufig eines oder mehrere Zugangstore zum Einführen von Materialien in dasselbe und zum Entfernen von Materialien von dem Fach aufweisen (z. B. zum Einführen von Proben und Reagenzien, zum Spülen des Fachs oder einer Region desselben mit Fluid von einem externen Behälter).

Das Probenvorbereitungsfach wird ferner eine oder mehrere "Reaktionszonen" zur chemischen Manipulation des Oligonukleotidanalyts aufweisen, wie es oben beschrieben worden ist. Diese Reaktionszonen sind Regionen, in denen Reaktionspartner und Katalysatoren eine ausreichende Zeit lang räumlich positioniert sind, um die beabsichtigte Reaktion auszuführen. Es ist nützlich und oft wesentlich, eine gleichmäßige und konstante Temperatur in einer Reaktionszone zu halten. Somit wird davon ausgegangen, daß das Probenvorbereitungsfach Temperatursteuerungsgeräte (z. B. Sensoren, Thermoelemente, Heizer und eine adäquate thermische Isolation, die die Reaktionszonen umgibt, um ein unbeabsichtigtes Querheizen anderer Regionen des Fachs zu verhindern) aufweisen wird. Wo es speziell erwünscht ist, eine PCR-(Polymerisations-Kettenreaktion-)vermittelte Verstärkung und keine isothermische Verstärkung durchzuführen, sind gleichmäßige Temperaturprofile, schnelle Temperaturdurchläufe und eine genaue Temperatursteuerung wesentlich. Ein Computer-gesteuerter Peltier-Heizer/Kühler ist für diesen Zweck nützlich. Siehe beispielsweise in P. Wilding, M.A. Shoffner und L.J. Kricka, "PCR in a Silicon Microstructure", Clin. Chem. 40 (9), 1815—1818 (1994). Unter Voraussetzung des gegenwärtigen Stands der Technik, der von M.A. Northrup, M.A. Burns u. a. (Cambridge Healthtech Institute Conference on Microfabrication Technology, 28.—29. September 1995, San Francisco, CA) offenbart ist, kann ein außerordentlich schneller und genauer thermischer zyklischer Durchlauf erreicht werden (z. B. unter Verwendung eines Geräts mit 35 V und 0,5 Ampere ist es möglich, eine Rampenrate mit 30°C pro Sekunde zu erreichen). Eine ausreichende Isolation kann durch einen korrekten Entwurf der Heizkammer und durch die Verwendung von geeigneten, in der Fachwelt bekannten Materialien erreicht werden (z. B. mehrschichtiges Silizium und Siliziumnitrid).

Der Ausdruck "Oligonukleotid" wird hierin verwendet, um auf natürlich auftretende oder synthetische Doppel- und Einzelstrang-DNS-Moleküle und Doppel- und Einzelstrang-RNS-Moleküle zu verweisen.

Die Ausdrücke "Analyt", "Probenanalyt" und "Oligonukleotid-Analyt" werden in dieser Anmeldung austauschbar verwendet, um auf eine oder mehrere Oligonukleotid-Spezies zu verweisen, deren Massen durch die Technik der MALDI-TOF-MS gemessen werden sollen. Vor der Analyse kann das Analyt eine Verstärkung, eine

kovalente Modifikation, eine Konzentration oder eine Trennung von potentiell störenden Molekülen und Ionen in dem Probenvorbereitungsfach benötigen. Der Ausdruck "Analyse" wird hierin verwendet, um auf die Anwendung der MALDI-TOF-MS zur Erfassung und Strukturklärung eines Oligonukleotid-Analys zu verweisen.

Ein Oligonukleotid-Analyt kann aus einer Vielzahl von natürlichen Quellen, wie z. B. biologischen Fluiden oder Gewebeextrakten, genetischer DNS oder RNS von Mikroorganismen, Viren, Rekombinantenzellen, Lebensmittelstoffen und Umweltmaterialien, erhalten werden, oder dasselbe kann durch chemische Synthese (z. B. Sequenzen, die durch eine kombinatorische Synthese hergestellt werden) erhalten und zur Verwendung bei der vorliegenden Erfindung durch eine Vielzahl von Einrichtungen (z. B. Proteasedigestionen, chaotropische Salzextraktionen, organische Extraktionen und dergleichen) vorbereitet werden. Es wird davon ausgegangen, daß Einrichtungen zum Handhaben unprozessierter Proben von Fachleuten ohne eine übermäßige Experimentierung in die vorliegende Erfindung aufgenommen werden können.

Die Ausdrücke "Analyt-Bindepartner" und "Oligonukleotid-Bindepartner" werden hierin verwendet, um auf Moleküle zu verweisen, die allgemeine Strukturmerkmale (z. B. Einzel- oder Doppelstrang) des "Zielanalyts" (d. h. des Oligonukleotids, das an den Bindepartner gebunden werden soll) erkennen können. Alternativ kann der Bindepartner spezifische Nukleotidsequenzen in dem Zielanalyt erkennen. Bindepartner können Oligonukleotid-Bindeproteine und Antikörper sowie Oligonukleotid- oder Peptid-Nukleinsäuren aufweisen, die homologe Basispaarsequenzen für eine Wasserstoffbindung an das Zielanalyt aufweisen. Jeder der vorher erwähnten Typen von "Analyt-Bindepartnern" kann in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, wenn dieselben eine ausreichend hohe Bindeaffinität und Selektivität für das Zielanalyt aufweisen, um es zu ermöglichen, daß die Erfindung ausgeführt werden kann.

Der Ausdruck "MALDI" wird hierin verwendet, um auf die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation zu verweisen, welche ein Verfahren ist, bei dem das Analyt in einer festen oder kristallinen "Matrix" von Licht-absorbierenden Molekülen (z. B. Nikotin-, Senf- oder 3-Hydroxypicolin-Säure) eingebettet wird, wonach dasselbe durch Laserstrahlung desorbiert und von der festen Phase in die gasförmige oder Dampfphase erwärmt wird und als intakte Molekularionen zu einem Detektor hin beschleunigt wird. Die "Matrix" ist typischerweise eine schwache organische Säure, die in Lösung mit dem Analyt in einem molaren Verhältnis von Matrix zu Analyt von 10.000:1 gemischt ist. Die Matrixlösung kann vor der Verwendung auf einen neutralen pH-Wert eingestellt werden.

Der Ausdruck "MALDI-TOF-MS" wird hierin verwendet, um auf die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation-Laufzeit-Massenspektrometrie zu verweisen (MALDI-TOF-MS = Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry).

Der Ausdruck "MALDI-Ionisationsoberfläche" wird hierin verwendet, um auf eine Oberfläche zum Überbringen eines Matrix-eingebetteten Analyts zu einem Massenspektrometer zur MALDI zu verweisen. Im allgemeinen werden die Ausdrücke "Sonde" oder "Sondenelement" austauschbar verwendet, um auf ein Gerät zum Überbringen des Analyts zu einem Massenspektrometer zur Strahlung und Desorption zu verweisen.

Metalle, wie z. B. Gold, Kupfer und rostfreier Stahl, werden typischerweise verwendet, um MALDI-Ionisationsoberflächen zu bilden. Weitere kommerziell verfügbare inerte Materialien (z. B. Glas, Silika, Nylon und andere synthetische Polymere, Agarose und andere Kohlehydrat-Polymere und Kunststoffe) können verwendet werden, wenn es erwünscht ist, die Oberfläche zu verwenden, um aktiv ein Analyt einzufangen, oder als Reaktionszone für eine chemische Modifikation des Analyts. Eine allgemeine Beschreibung nützlicher Verfahren zum Modifizieren von MALDI-Ionisationsoberflächen für eine spezifische oder nicht-spezifische Absorption von Biopolymeren existiert von W.T. Hutchens, "Affinity Mass Spectrometry, In: Methods in Enzymology, 1995 (B. Karger & W.S. Hancock, Hrsg.), wobei diese Schrift hierin durch Bezugnahme aufgenommen ist. Die Verwendung von Nafion und Nitrozellulose-beschichteten MALDI-Sonden für eine Auf-Sonden-Entfernung von Salzen von PCR-verstärkten Gensequenzen wird von Y-H. Liu u. a., Rapid Commun. Mass Spec. 9, 735-743 (1995), berichtet. Tang u. a. berichteten die MALDI-Analyse von kurzen DNS-Duplexsonden mit einem Strang, welcher auf einem festen Träger (Streptavidin-beschichtete Magnetperlen oder Glasperlen mit gesteuerten Poren) immobilisiert sind.

Der Ausdruck "Efangregion" wird hierin verwendet, um auf eine Region oder auf Regionen in dem Probenüberreichungsfach zu verweisen, in der Probenhandhabungsfunktionen, die eine Immobilisation des Analyts erfordern, durchgeführt werden können (z. B. eine Konzentration von Analyten aus einer schwachen Lösung, ein Entfernen von potentiell störenden Molekülen und Ionen, die zu Anfang in der Probe vorhanden sind oder während der Analythandhabung eingeführt werden, einen Pufferaustausch und dergleichen).

Efangregionen können durch bekannte Verfahren zum Anhaften von biologischen Molekülen an festen Trägern gebildet werden. Siehe beispielsweise allgemein in Affinity Techniques Enzyme Purification: Part B. Methods in Enzymology, Bd. 34, Hrsg. W.B. Jakoby, M. Wilchek, Acad. Press, NY (1974) und Immobilized Biochemicals and Affinity Chromatography, Advances in Experimental Medicine and Biology, Bd. 42, Hrsg. R. Dunlap, Plenum Press, NY (1974), wobei diese Schriften hierin durch Bezugnahme aufgenommen sind. Die Oberfläche einer Perle beispielsweise oder eines Partikels oder eines planaren Trägers kann mit einem bifunktionalen Vernetzungsreagenz (d. h. einem Vernetzungsreagenz mit gleichen oder unterschiedlichen chemischen Reaktivitäten an jedem Ende eines molekularen Vernetzungsmittels) behandelt sein, um ein Ende des Reagenz an reaktive Gruppen auf der Oberfläche anhaften zu lassen, und das entgegengesetzte Ende an ein biologisches Molekül. Der Vernetzer weist vorzugsweise eine ausreichende Länge auf, um es zu erlauben, daß anhaftende biologische Moleküle frei mit Verbindungen in Lösung interagieren. Vernetzungsgruppen können an der Oberfläche durch Siloxanbindungen unter Verwendung von Organosilanen, wie z.B. 3-Glycidoxypropyl-Trimethoxysilan ("GOPS"), 3-Aminopropyltriethoxysilan (APS) und dergleichen angehaftet werden, welche in der Chemie bekannt sind. Zur Immobilisierung von Oligonukleotid-Sonden an SiO₂-Oberflächen unter Verwendung von Epoxy-Silan- und Amin-modifizierten Oligonukleotid-Sonden wird auf Eggers u. a., Bio Techniques 17, 516-524

(1994) verwiesen. Ein weiteres bevorzugtes Verfahren zum Immobilisieren von biologischen Mol külen an Oberflächen besteht darin, ein Avidin- oder Streptavidin-Protein an die Oberfläche anzuhaften und anschließend die Oberfläche mit einem Analytbindepertner reagieren zu lassen, der kovalent an Biotin oder ein Biotinanalogen gebunden ist. Avidin und Streptavidin binden Biotin nicht-kovalent, jedoch mit einer sehr hohen Affinität (das K_a beträgt etwa 10^{15}M^{-1}). Siehe in Green, "Avidin" in *Advances in Protein chemistry*, Academic Press, Bd. 29, 105 (1975). Biotinilierte Oligonukleotide können vorbereitet werden, wie es in der Literatur beschrieben ist. Siehe beispielsweise Bayer u. a., *Methods f Biochemical Analysis*, Bd. 26 (D. Glick, Hrsg.), 1-45 (1980) und *Current Protocols in Molecular Biology*, Ergänzung 20 (John Wiley & Sons, Inc.), wobei diese Schriften hierin durch Bezugnahme aufgenommen sind.

Gemäß der Ausführung der vorliegenden Erfindung kann eine Einfangregion in irgendeiner Mikrostruktur-oberfläche in dem Probenvorbereitungsfach durch Vernetzen eines Analytbindungspartners direkt an der Oberfläche und auf MALDI-Ionisationsoberflächen gebildet werden, die mit dem Probenfach integriert sind. Alternativ kann eine Einfangregion auf den Oberflächen von Perlen gebildet sein, welche chemisch an der Oberfläche des Trägers befestigt sein können, oder welche magnetisch unter Verwendung von magnetisch-ansprechenden Perlen magnetisch befestigt werden können, indem ein Magnetfeld angelegt wird, um die Perlen an der gewünschten Region des Trägers festzumachen. Magnetisch ansprechende Perlen und Partikel sind in der Technik bekannt und beispielsweise von Dynal (Dynal ist ein eingetragenes Warenzeichen), Inc. (Lake Success, NY) und von Bangs Laboratories, Inc. (Carmel, IN), erhältlich.

Zusätzlich zu Affinitätsfangverfahren, welche für die Ausführung der Erfindung bevorzugt werden, kann ein Analyteinfangen durch Wasserabweisungs- oder Ladungs-Interaktionen oder durch Chelatbildungsmechanismen bewirkt werden, wie es weiter oben gezeigt wurde.

Ein eingefangenes Oligonukleotid-Analyt kann durch verschiedene in der Technik bekannte Verfahren wieder in Lösung entlassen werden, um Oligonukleotid-Doppel zu denaturieren, oder Oligonukleotid-Protein-Bindungskomplexe mit hoher Affinität durch Aufbrechen von H-Bindungen und/oder durch Bewirken von polaren oder nicht-polaren Interaktionen (z. B. Ändern der Temperatur, des pH, der Lösungspolarität, Verwenden von chaotropischen Salzen, lokalisiertes Erwärmen mit Laserstrahlung und dergleichen) aufzubrechen. Veränderungen der elektrischen Feldstärke können verwendet werden, um elektrostatisch-vermittelte Bindungsinteraktionen zwischen eingefangenen Oligonukleotiden und ihren Bindungspartner aufzubrechen. Ein auf einem magnetisch ansprechenden Partikel eingefangenes Analyt kann mobilisiert werden, indem die magnetische Feldstärke verändert wird. Beim Ausführen dieser Erfindung wird davon ausgegangen, daß die Erwärmung der MALDI-Oberfläche verwendet werden kann, um ein Lösen eines Oligonukleotids von einer Einfangregion, die in derselben positioniert ist, zu erleichtern.

Der Ausdruck "Reaktionszone" wird in dieser Anmeldung verwendet, um auf eine Region in dem Probenvorbereitungsfach zu verweisen, die einen immobilisierten Katalysator (z. B. ein Enzym, einen katalytischen Antikörper, eine katalytische Oberfläche, die durch Molekularaufdrucken gebildet ist, ein Ribozym und dergleichen) enthält. Die Immobilisierung von Katalysatoren in einer Reaktionszone kann durch irgendein bekanntes Verfahren erreicht werden, das stabile Verbindungen und eine ausreichende katalytische Aktivität schafft, um die vorliegende Erfindung auszuführen (oben unter "Erfassungsregion" beschrieben).

Die Reaktionszone kann in einem Mikrokanal, einem Topf oder in einer anderen Mikrostruktur in dem Probenvorbereitungsfach oder auf einer MALDI-Ionisationsoberfläche gebildet werden. Eine Mehrzahl von Reaktionszonen kann in dem gleichen Probenvorbereitungsfach zum gleichzeitigen Ausführen einer einzelnen Reaktion unter verschiedenen Reaktionsbedingungen (z.B. zum Optimieren einer PCR-Reaktion) oder für aufeinanderfolgende chemische Manipulationen eines Oligonukleotid-Analyts (z. B. Restriktionsenzymdigestionen, Sequenzierungsreaktionen) oder zum gleichzeitigen Ausführen von Reaktionen mit vielen Analyt-Spezies oder für eine Kombination der vorstehend genannten Verfahren versehen sein.

Typischerweise werden die Reaktionszonen dieser Erfindung individuell Temperatur-gesteuert sein und an Mikrokanäle angrenzen. Es wird davon ausgegangen, daß Mikroventile und/oder ventillöse Pumpen in dem Probenvorbereitungsfach geeignet positioniert sein werden, um den Analytfluß zu geeigneten Reaktionszonen zu lenken. Eine Einrichtung zum Bewegen des Analyts von einem Punkt zu einem anderen in dem Probenvorbereitungsfach kann verwendet werden, um lösliche Reaktionspartner vor oder nach dem Eintritt in eine Reaktionszone zu mischen (z. B. Elektroosmose, Elektrokinese, hydrodynamischer Fluß oder irgendeine andere Technik, die dafür bekannt ist, daß sie zur Verwendung bei miniaturisierten Probenhandhabungsgeräten geeignet ist).

Der Ausdruck "Oberflächenbehandlung" wird in dieser Anmeldung verwendet, um auf die Vorbereitung oder Modifikation der Mikrostrukturoberflächen der Probenvorbereitungskammer zur Biokompatibilität und zur Verhinderung einer nicht-spezifischen Adsorption von Biomolekülen zu verweisen. Solche Behandlungen umfassen das Beschichten von Oberflächen mit Proteinen, mit nicht-reaktiven Silanen, mit Teflonstoffen und mit anderen Polymeren, die in der Technik bekannt sind, um eine nicht-spezifische Adsorption von Biomolekülen an der Oberfläche während der Probenhandhabung zu reduzieren oder zu beseitigen (siehe beispielsweise in C. Schöneich u. a., *Anal. Chem.* 65, 67R-84R (1993) bezüglich einer detaillierten Beschreibung von Verfahren, die in der Technik verwendet werden).

Der Ausdruck "Verstärkung" wird in dieser Anmeldung verwendet, um auf irgendein In-Vitro-Verfahren zum Erhöhen der Kopieanzahl einer Zielnukleinsäuresequenz zu verweisen. Verstärkungstechniken umfassen solche Techniken, die einen zyklischen Temperaturdurchlauf benötigen (z. B. die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die Ligase-Kettenreaktion (LCR) und die Polymerase/Ligase-Kettenreaktion (PLCR)) und solche Techniken, welche unter isothermischen Bedingungen durchgeführt werden können (z. B. eine Strangverschiebungsverstärkung (SDA; SDA = Strand Displacement Amplification), eine Nukleinsäuresequenz-basierte Verstärkung (NASBA; NASBA = Nucleic Acid Sequence Based Amplification), und eine sich selbst unterhaltende oder

kritische Sequenzwiederholung (3SR; 3SR = Self-Sustained Sequence Replication)).

Die Polymerase-Kettenreaktions-(PCR-)Technik, welche die erste Verstärkungstechnik war, die entwickelt worden ist, und welche die Technik mit den breitesten Anwendungen zur Verwendung der vorliegenden Erfindung für eine genetische Diagnose in einem klinischen Laborumfeld ist, betrifft die Denaturierung eines DNS-DNS-Doppel, das die Zieloligonukleotid-Sequenz zur Verstärkung enthält, und zwar bei einer Temperatur von etwa 94°C, das Ausheilen von Vorbereitungsstoffen an jeden der Modellstränge bei Positionen, die die Zieloligonukleotid-Sequenz flankieren, bei etwa 55°C oder 60°C, und die Vorbereitungsstofferweiterung mit einer thermophilen DNS-Polymerase bei etwa 72°C. Diese Reaktionssequenz wird ungefähr 30 Zyklen wiederholt, wobei Erweiterungsprodukte von jedem Zyklus als Ziel in dem nächsten Zyklus dienen, wodurch eine exponentielle Verstärkung erzeugt wird.

Der Ausdruck "transparent", wie er in dieser Anmeldung verwendet wird, verweist auf die Fähigkeit eines Materials Licht verschiedener Wellenlängen durchzulassen, was als der Strahlungsprozentsatz gemessen werden kann, der eine Strecke von einem Meter durchdringt. Bei der Ausführung der vorliegenden Erfindung ist beispielsweise die obere Oberfläche des Probenvorbereitungsfachs vorzugsweise transparent, um es zu erlauben, daß die Probenhandhabung mikroskopisch überwacht werden kann, falls es erwünscht ist, und um eine Laserbestrahlung des Probenvorbereitungsfachs zu ermöglichen, falls es notwendig ist.

"Optional" oder "auf optionale Weise" bedeutet, daß das darauffolgend beschriebene Merkmal oder die darauffolgend beschriebene Struktur in dem Analysesystem vorhanden sein kann oder nicht, oder daß das darauffolgend beschriebene Ereignis oder der darauffolgend beschriebene Umstand auftreten kann oder nicht, und daß die Beschreibung Fälle umfaßt, bei denen das Merkmal oder die Struktur vorhanden ist, und Fälle, bei denen das Merkmal oder die Struktur abwesend ist, oder Fälle, bei denen das Ereignis oder der Umstand auftritt, und Fälle, bei denen dies nicht so ist. Der Satz "die Einfangregion ist optional mit Zugangstoren versehen" bedeutet beispielsweise, daß die Einfangregion mit Zugangstoren versehen sein kann oder nicht, und daß die Beschreibung beide Umstände, und zwar ob Zugangstore vorhanden sind oder nicht, umfaßt.

Der Ausdruck "Vakuumentor", wie er in dieser Anmeldung verwendet wird, verweist auf eine Öffnung in der Vakuumkammer eines Massenspektrometers zum Einfügen der MALDI-Ionisationsoberfläche in denselben.

Falls nichts anderes gesagt ist, wird die Ausführung der vorliegenden Erfindung herkömmliche Techniken der Molekularbiologie und der Rekombinanten-DNS-Technologie verwenden, welche in der Technik bekannt sind. Diese Techniken sind in der Literatur vollständig erklärt. Siehe beispielsweise in Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc.) und G.H. Keller und M.M. Manak, DNA Probes, zweite Ausgabe (Stockton Press, 1993), wobei diese Schriften hierin durch Bezugnahme aufgenommen sind.

Gemäß der Erfindung kann ein integriertes Nukleinsäureanalysesystem für die MALDI-TOF-MS in einer einzelnen preisgünstigen Einweeinheit aufgebaut sein, welche hauptsächlich aus einem nicht-leitenden Material, wie z. B. aus Glas, Silizium oder einem preisgünstigen Kunststoffpolymer, gebildet ist. Die Einheit kann Mikrokanäle, Reaktionszonen zum Ausführen von chemischen und enzymischen Reaktionen, Schnittstellen zu Nicht-Einwegteilen und eine Ionisationsoberfläche für die MALDI-TOF-MS umfassen. Durch Verwenden sich entwickelnder Technologien, die in der Mikrobearbeitung und Nanotechnologie gefunden werden können, können preisgünstige Dünnfilmträger mit Mikrokanälen, Mischkammern, Töpfen und Ventilen geätzt werden, um es zu ermöglichen, daß ein Oligonukleotid-Analyt eingeführt wird, durch eine Serie von chemischen Manipulationen, welche räumlich und daher zeitlich getrennt sind, bewegt wird, und auf einer MALDI-Ionisationsoberfläche abgelegt wird, die schnittstellenmäßig mit einem Massenspektrometer verbunden ist. Die gesamte Sequenz von Schritten von der Probeneinführung zur Probenerfassung kann automatisiert werden.

Ein spezielles Ausführungsbeispiel der Erfindung in ihrer einfachsten Form ist in den Fig. 1 und 2 gezeigt. Fig. 1 ist eine Explosionsansicht eines integrierten Analysesystems, das den Dünnfilmträger, der allgemein mit 10 bezeichnet ist, mit Komponenten des Probenvorbereitungsfachs zeigt, das in der oberen Oberfläche (12) des Trägers definiert ist. Die obere Oberfläche ist optional von einer Abdeckung (14) umgeben, die befestigbar über der Trägeroberfläche ausgerichtet ist, um ein Flüssigkeits-dichtes Probenvorbereitungsfach unter Verwendung von Druckabdichtungstechniken durch Verwenden einer externen Einrichtung, um die Stücke zusammenzudrücken (z. B. Halter oder Spannungsfedern), oder durch Verwenden von in der Technik des Polymerverbindens bekannten Klebstoffen zu bilden. Die Abdeckung ist vorzugsweise aus einem transparenten Material gebildet, um eine mikroskopische Beobachtung der Probeneinführung und der Handhabungsschritte und zur Laserbestrahlung zu erlauben. Die Abdeckung umfaßt Öffnungen (16, 18, 20), die räumlich mit Töpfen (24, 26 und 28 in Fig. 2A) ausgerichtet sind, und eine Öffnung (22), die mit einer MALDI-Ionisationsoberfläche (30) in dem Probenvorbereitungsfach ausgerichtet ist, um Zugangstore zu bilden, wenn die Abdeckung auf dem Träger befestigt ist. Die MALDI-Ionisationsoberfläche (30) besteht vorzugsweise aus einem typischen MALDI-Oberflächenmaterial, wie z. B. Gold, dieselbe kann jedoch auch aus anderen bekannten Materialien hergestellt werden, falls es notwendig ist, wie es oben detailliert beschrieben worden ist. Eine Reaktionszone (32) ist zwischen der MALDI-Ionisationsoberfläche und den Probentöpfen positioniert. Die Reaktionszone ist mit einer Einrichtung zum Immobilisieren von Enzymen versehen, um die Synthese, Digestion, Fragmentierung, kovalente Modifikation, die umgekehrte Transkription und weitere Reaktionen von Nukleinsäure- und Oligonukleotid-Substraten zu katalysieren, wobei die Reaktionszone ferner mit einer Einrichtung zum Ausführen dieser Reaktionen in einer Temperatur-gesteuerten Umgebung (34) versehen ist. Es wird davon ausgegangen, daß katalytische Antikörper, Ribozyme und weitere Biokatalysatoren bei der vorliegenden Erfindung verwendet werden können. Die Verbindungen zwischen den Töpfen, der Reaktionszone und der MALDI-Ionisationsoberfläche ist durch Mikrokanäle implementiert. Ein solcher Mikrokanal ist bei 36 gezeigt. Es ist ohne weiteres offensichtlich, daß die Darstellung des Mikrokanals (36) in einer im allgem. inen ausgedehnten Form lediglich aus Darstellungsgründen gegeben ist, wobei diese Darstellung die Gestalt und Geometrie von Mikrokanälen dieser Erfindung nicht begrenzen soll. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Probenvorbereitungsfach mit einer Mehrzahl von Mikrokanälen.

Ferner ist die räumliche Anordnung von Töpfen, Reaktionszonen und Ionisationsoberflächen auf dem Träger teilweise durch die analytischen Prozeduren und ihre Anforderungen bestimmt, wobei diese nicht durch irgendeine spezielle in den Figuren gezeigte Anordnung begrenzt sein soll.

Fig. 2B ist eine Draufsicht der äußeren unteren Oberfläche (8) des Dünnfilmträgers, welche elektrische Verbindungen (42, 44, 46, 48) und eine Peltier-Oberfläche (50) zeigt, die positioniert ist, um eine Temperatursteuerung für die Reaktionszone zu schaffen. Bei diesem Ausführungsbeispiel der Erfindung ist es beabsichtigt, daß der Dünnfilmträger auf einer Vorbereitungsstation plaziert wird, welche elektrische Verbindungen für jeden der Töpfe schaffen wird, und welche eine Temperatursteuerung über die Peltieroberfläche (50) bereitstellen wird.

Wie es ferner detaillierter oben beschrieben worden ist, ist es beabsichtigt, lokale magnetische Felder an ausgewählte Regionen des Dünnfilmträgers anzulegen, welche magnetisch ansprechende Partikel als Einrichtung zum Bewegen der Partikel von einer Region des Probenvorbereitungsfachs zu einem anderen anzulegen.

Demgemäß wird beim Ausführen der Erfindung ein kleines Volumen eines Oligonukleotid-Analyts (z. B. 1 µg oder weniger) in einen Probentopf injiziert und automatisch von dem Topf zu dem Mikrokanal bewegt. Zwecks dieser Diskussion wird angenommen, daß Analyte und Reagenzien in Töpfe injiziert werden und durch elektromotorische Kräfte, die auf geladene Moleküle elektrophoretisch wirken, und auf ungeladene Moleküle osmotisch wirken, von Punkt zu Punkt bewegt werden. Gleichzeitig werden Reagenzien in einen zweiten Topf injiziert und von dem Topf zu dem Mikrokanal bewegt, indem sie sich mit dem Analyt mischen. Die Reaktionsmischung wird in die Reaktionszone bewegt und in Kontakt mit einem in derselben enthaltenen immobilisierten Enzym gebracht. Die Reaktionszonentemperatur wird automatisch gemessen und auf eine gewünschte Reaktionstemperatur eingestellt, auf der dieselbe für eine feste Zeit (unter der Annahme von isothermischen Reaktionsbedingungen) konstant gehalten wird. Das Oligonukleotid-Analyt kann unter statischen Bedingungen reagieren, indem der Fluß ausgeschaltet wird, oder dasselbe kann dynamisch in der Reaktionsregion gemischt werden, indem das elektrische Potential oder das magnetische Feld oder eine Druckdifferenz an der Reaktionszone oszillieren, um zu bewirken, daß der Fluß hin und her geht. Das reagierte Oligonukleotid-Analyt wird auf die MALDI-Ionisationsoberfläche bewegt, mit der Matrix gemischt und getrocknet, wonach der Träger in das MALDI-TOF-MS-Vakuumsystem übertragen wird, um das MALDI-Experiment zu beginnen. Nach der Messung wird der Träger entfernt und weggeworfen.

Die Immobilisierung von Enzymen in einer Reaktionszone bietet mehrere wichtige Vorteile gegenüber der Verwendung von Enzymen in Lösung an, von denen im nachfolgenden einige genannt sind: eine erhöhte Enzymstabilität; ein geringerer Verlust eines Enzyms durch nicht-spezifische Adsorption an Oberflächen; einen verringerten oder vernachlässigbaren Übertrag eines Enzyms zu anderen Reaktionszonen; und die Fähigkeit, eine hohe Enzymkonzentration für eine katalytische Reaktion mit einer sehr kleinen Konzentration eines Substrats zu erreichen, um kinetische Raten von schwachen Probenlösungen zu verbessern, ohne die molare Konzentration des Enzyms in Lösung zu erhöhen, wodurch die Verschmutzung des Analyts mit Enzymunreinheiten minimiert wird.

Der Vorteil des Integrierens des Probenvorbereitungsfaches mit der MALDI-Ionisationsoberfläche besteht darin, eine automatisierte chemische Manipulation von analytischen Proben vor der Analyse durch die MALDI-TOF-MS ohne irgendeine manuelle Probenhandhabung zu ermöglichen, wodurch eine Verschmutzung und ein Probenverlust reduziert werden, während eine spezifische chemische Vorbehandlung vor der MALDI-Analyse erlaubt wird, um die Selektivität, die Empfindlichkeit und/oder die Reproduzierbarkeit der Messungen zu steigern. Dieses Merkmal wird von besonderer Wichtigkeit sein, wenn die volle Empfindlichkeit der MALDI-TOF erreicht werden soll. Mit besonderer Bezugnahme auf die vorliegende Erfindung schafft die Integration eines miniaturisierten Nukleinsäureanalysesystems mit der Fähigkeit des Verstärkens von kleinen Mengen von Oligonukleotid-Analyten mit der MALDI-TOF-MS eine sehr empfindliche, genaue, schnelle und reproduzierbare Technik zu Erfassen und Erklären der Struktur von Oligonukleotiden, die in relativ kleinen Mengen in klinischen und forensischen Proben vorhanden sind. Die Empfindlichkeit der Erfassung (zwischen 10^{-12} bis 10^{-15} Mol eines Oligonukleotids, das auf einer MALDI-Ionisationsoberfläche abgelegt ist) bedeutet, daß ein Oligonukleotid-Analyt nicht bis zu dem Grad verstärkt werden muß, der für andere analytische Techniken notwendig ist, wohingegen die Meßgeschwindigkeit (in der Größenordnung von ein paar Minuten) das Durchführen von mehreren Massenbestimmungen in einem einzigen Experiment erlauben sollte. Die Verwendung von wegwerfbaren Sonden soll die Probenverschmutzung minimieren.

Bezugnehmend nun auf Fig. 3A sind bei einem bevorzugten Ausführungsbeispiel der Erfindung mehrere Reaktionszonen (60) räumlich auf der Trägeroberfläche angeordnet. Jede Zone kann das gleiche oder auch ein verschiedenes immobilisiertes Enzym enthalten. Eine Mehrzahl von MALDI-Ionisationsoberflächen (allgemein bei 62 gezeigt) ist in dem Probenvorbereitungsfach distal zu den Reaktionszonen positioniert enthalten. Die verbindenden Fluid-gefüllten Mikrokanäle (64) sind optional mit umkehrbaren Abdichtungseinrichtungen (66) (z. B. einem thermisch ausdehnbaren Metall mit einer lokalen Heizeinrichtung) zum Abdichten der Kanäle verbunden, wenn die MALDI-Oberflächen schnittstellenmäßig mit dem Vakuumtor des Massenspektrometers verbunden sind. Einfangregionen (68) sind zwischen aufeinanderfolgenden Reaktionszonen angeordnet. Wie es oben detailliert beschrieben worden ist, sind diese Regionen chemisch oder magnetisch angepaßt, um nach der Verarbeitung ein Oligonukleotid-Analyt selektiv zu halten. Dieses Merkmal ermöglicht es, daß Verschmutzungstoffe, die während einer chemischen Reaktion eingeführt worden sind, durch Waschen des Analyts vor der Messung in dem Massenspektrometer entfernt werden können, oder bevor zusätzliche Reaktionen mit dem Analyt durchgeführt werden, oder bevor das Analyt für andere Zwecke gesammelt wird. Somit ist jede Einfangregion optional mit Töpfen (70) und Zugangstoren (72, Fig. 3B) in der Dünnfilmträgerabdeckung (74, Fig. 3B) versehen. Die Richtungsbewegung eines Analyts von einer Reaktionszone zu einer Einfangregion und von einer Einfangregion zu einer MALDI-Ionisationsoberfläche oder alternativ von einer Einfangregion zu der nächsten

Reaktionszone in der Serie wird durch Mikroventile (nicht gezeigt) gesteuert. Bezugnehmend auf Fig. 3A speist eine Mehrzahl von Töpfen (76), die durch Mikrokanäle miteinander verbunden sind, jeweilige Reaktionszonen.

Als Beispiel einer aufeinanderfolgenden Verarbeitung eines Analyts wird ein Analyt zuerst in der Zone 60 reagiert, dann in seine entsprechende Einfangregion zum Waschen bewegt, wonach es losgelassen wird und in die Zone 78 bewegt wird.

Nach der Reaktion in der Zone 78 wird das Analyt zu der nächsten Einfangregion usw. bewegt, bis die gewünschte Reaktionssequenz vollendet worden ist. Nach einem abschließenden Einfangschritt und Waschschrift wird das Analyt zur Bewegung zu seiner entsprechenden MALDI-Ionisationsoberfläche (62) oder zu einem Sammlungstopf (allgemein bei 70 gezeigt) losgelassen.

Als Beispiel einer gleichzeitigen Verarbeitung von einem oder mehreren Analyten durch einen einzigen Reaktionsschritt können die einzelnen Reaktionszonen voneinander getrennt werden, indem der Verbindungsmikrokanal verschlossen wird, wie es gezeigt ist. Das Probenanalyt und die Reagenzien können in den Mikrokanal für jede gegebene Zone injiziert werden, wie es vorher für das in den Fig. 1 und 2 gezeigte Ausführungsbeispiel beschrieben worden ist.

Ein alternatives bevorzugtes Ausführungsbeispiel der Erfindung ist in den Fig. 4A und 4B gezeigt. Hier ist die MALDI-Ionisationsoberfläche in einem drehbaren Kammgerät (allgemein bei 90 gezeigt) mit einer Handhabungseinrichtung (92) und Zähnen gezeigt. Die Zähne können hohle, rohrartige Strukturen (94) sein, die sich nach oben erstrecken, um MALDI-Ionisationsoberflächen (96) in der Handhabungseinrichtung zu bilden, oder die Zähne können feste Zahndochte mit Analyteinfangregionen (Fig. 4B; 98) sein. Wenn der Kamm zu einer ersten Position gedreht wird, werden die Spitzen der Zähne in Kontakt mit Fluidanalyt-enthaltenden Töpfen in dem Probenvorbereitungsfach gebracht, was dazu dient, daß dieselben dadurch das Fluidanalyt durch Kapillarkwirkung in die röhrenartigen Zähne ziehen. Das Analyt wird mit der Matrix in dem Handhabungsabschnitt der Röhre gemischt und anschließend auf der Ionisationsoberfläche (96) getrocknet. Alternativ wird das Analyt aktiv auf Zahndochteinfangregionen (98) eingefangen. Beim Drehen des Kamms in eine zweite Position wird die MALDI-Ionisationsoberfläche, die entweder in der Kammhandhabungseinrichtung (Fig. 4A; 96) positioniert ist, oder die die Zahndochteinfangregion (Fig. 4B; 98) aufweist, mit dem Vakuumtor eines Massenspektrometers zum Einführen in dasselbe ausgerichtet. Die Matrix wird auf der Einfangoberfläche der Zahndochte aufgebracht und kann vor dem Einführen der Zahndochte in das Massenspektrometervakuumtor trocknen.

Das folgende Beispiel wird gebracht, um Fachleute mit einer vollständigen Offenbarung und Beschreibung zu versehen, wie das Verfahren der Erfindung verwendet werden soll, wobei dieses Beispiel jedoch nicht den Bereich der Erfindung begrenzen soll. Es wurden Anstrengungen unternommen, um die Genauigkeit bezüglich von Zahlen (z. B. Mengen, Temperatur, usw.) sicherzustellen, wobei jedoch bestimmte Fehler und Abweichungen möglich sein können. Es sei denn, daß etwas anderes gesagt ist, sind Teile Gewichtsteile, während die Temperatur in °C angegeben ist, und der Druck atmosphärisch oder nahezu atmosphärisch ist.

Beispiel

PCR-verstärkung von HLA-DQ α -Stoffen

Die folgenden flankierenden Oligonukleotid-Vorbereitungsstoffe sind zur Verwendung beim Verstärken jedes der entsprechenden DQ α -Untertypen, welche nachfolgend aufgelistet sind, entworfen:

5	DQ ^m 1.1	a)	5'	CAG	TCT	CCT	TCC	TCT	CCA	3'
		b)	5'	TGG	AGG	TTT	TGA	CCC	GCA	3'
5	DQ ^m 1.2	a)	5'	GTA	GAA	CTG	CTC	ATC	TCC	3'
		b)	5'	TGG	AGG	TTT	TGA	CCC	GCA	3'
10	DQ ^m 1.3	a)	5'	ATT	CAT	GGG	TAT	ACT	GGC	3'
		b)	5'	TGG	AGA	AGA	AGG	AGA	CTG	3'
15	DQ ^m 2	a)	5'	AGA	GGC	AAC	TTC	CAG	GCA	3'
		b)	5'	AGA	TTT	GAC	CCG	CAA	TTT	3'
15	DQ ^m 3	a)	5'	TGG	CTG	TAC	TGC	CCA	GAG	3'
		b)	5'	GTT	CCG	CAC	ATT	TAG	AAG	3'
20	DQ ^m 4.1	a)	5'	TCC	CCA	GGT	CCA	CGT	AGA	ACT GCT 3'
		b)	5'	GTG	TTT	GCC	TGT	TCT	CAG	3'
20	DQ ^m 4.2	a)	5'	ACT	CCT	CAT	CTC	CAT	CAA	3'
		b)	5'	GTG	TTT	GCC	TGT	TCT	CAG	3'
25	DQ ^m 4.3	a)	5'	TGG	GTA	TAC	TGG	CCA	GAG	3'
		b)	5'	GTG	TTT	GCC	TGT	TCT	CAG	3'

30 Eine menschliche DNS wird aus 10 bis 50 µl Vollblut durch Lyse in 50 mM Tris-OH (pH 8,0), 50 mM EDTA, 1% SDS, 100 mM NaCl, 1% 2-Mercaptoethanol und Digestion mit Proteinase K (200 µg/ml Endkonzentration) und Ribonuklease A (100 µg/ml Endkonzentration) bereitet. Die DNS, die in dem Lysat enthalten ist, wird durch Phenolextraktion deproteinisiert, ausgefällt und in einem 100-µl-1×-TE-Puffer (10 mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA) wieder in Suspension gebracht.

35 Um die extrahierte DNS zu verstärken, wird ein Stoff in einer Menge von 2—3 µg der Verstärkungsreaktionsmischung hinzugefügt, wobei der Stoff einen Reaktionspuffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-OH, pH 8,4 bei 22°C, 2,5 mM MgCl₂ und 0,01% Gelatin), Vorbereitungsstoffe oder "Primer" (20 pmol) und Deoxynukleotid-Triphosphate (dNTPs) (20 nmol) enthält. Die Reaktionsmischung wird in die Probenvorbereitungsregion eingeführt und zu einer Reaktionszone bewegt, die eine immobilisierte Taq-Polymerase (2,5 Einheiten) enthält. Das Endvolumen der Verstärkungsreaktion beträgt 10 µl bis 20 µl. Die Temperatur der Reaktionszone wird auf 95°C erhöht, um die Ziel-DNS zu denaturieren, und anschließend bis zu einer Gesamtzahl von 25 bis 40 Zyklen zyklisch verändert, um die DNS zu verstärken. Typischerweise wird das Temperaturzyklusprofil eine Denaturierung bei 95°C für eine Minute, das Ausheilen bei 55 bis 60°C für 30 Sekunden und eine Erweiterung bei 72°C für eine Minute umfassen.

45 Nach der Vollendung der Verstärkung wird die verstärkte DNS von der Reaktionszone in den Mikrokanal bewegt, der zu der MALDI-Ionisationsoberfläche führt. Ein Anteil der DNS wird in die erste Einfangregion umgeleitet. Der Rest wird zu der MALDI-Ionisationsoberfläche bewegt. Der Mikrokanal, der die MALDI-Oberfläche mit der ersten Reaktionszone verbindet, wird abgedichtet, wonach die MALDI-Matrix hinzugefügt und getrocknet wird, wonach der Träger dann in das Vakuumtor des Massenspektrometers zur Erfassung gebracht wird.

50 Nachdem Massenmessungen durchgeführt worden sind, wird der Träger von dem Massenspektrometer entfernt, wonach die eingefangene DNS für eine weitere Analyse und Charakterisierung bereit ist.

Patentansprüche

55 1. Integriertes Nukleinsäureanalysesystem für eine Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation-Laufzeit-Massenspektroskopie (MALDI-TOF-MS), mit folgenden Merkmalen:

60 einem Dünnfilmträger (10) mit einer oberen Oberfläche (12) und einer unteren Oberfläche (8), wobei die obere Oberfläche (12) ein Probenvorbereitungsfach aufweist, und wobei die untere Oberfläche eine Einrichtung zum Bewegen eines Analyts und von Fluiden in dem Fach und eine Einrichtung (50) zum Steuern der Temperatur des Fachs aufweist, wobei das Probenvorbereitungsfach folgende Merkmale aufweist:
einen Topf (24, 26, 28; 70, 76) zum Aufnehmen von flüssigen Substanzen zur Probenvorbereitung;
eine Reaktionszone (32; 60), die eine Einrichtung zum Immobilisieren eines Katalysators an dieselbe aufweist, zum chemischen Manipulieren eines Oligonukleotid-Analyts in derselben, wobei die Zone (32; 60)
65 für eine Temperatursteuerung in einem Bereich von etwa 10°C bis etwa 100°C angepaßt ist; und
einen Mikrokanal (36; 64), der den Topf (24, 26, 28; 70, 76) und die Reaktionszonen (32; 60) verbindet;
eine MALDI-Ionisationsoberfläche (30; 96), die mit dem Probenvorbereitungsfach kommuniziert;
eine Einrichtung zum schnittstellenmäßig Verbinden des Dünnfilmträgers (10) mit einem Massenspektrometer.

trometer; und

einer Einrichtung zur automatischen Probenvorbereitung.

2. Analysesystem gemäß Anspruch 1, welches ferner folgende Merkmale aufweist:

eine Vorbereitungsstation zum steuerbaren Eingeben von Elektrizität, Wärme, Druck und Magnetisierung in das Probenvorbereitungsfach als Reaktion auf augenblickliche Probenhandhabungsanforderungen; und
eine Einrichtung (42, 44, 46, 48) zum schnittstellenmäßigen Verbinden des Probenvorbereitungsfachs mit der Vorbereitungsstation.

3. Analysesystem gemäß Anspruch 1 oder 2, bei dem das Probenvorbereitungsfach ferner ein Zugangstor (72) und mindestens eine Analyterfassungsregion (68) aufweist, die mit einem Mikrokanal (64) kommuniziert, wobei die Erfassungsregion angepaßt ist, um ein interessierendes Analyt von einer mit derselben in Kontakt stehenden Fluidmischung reversibel zurückzuhalten, wobei die Erfassungsregion (68) optional für eine Wärme-, für eine Magnetisierungs- und für eine elektrische Eingabe angepaßt und optional mit dem Zugangstor (72) ausgerichtet ist.

4. Analysesystem gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, bei dem die Reaktionszone (32; 60) ein immobilisiertes Enzym aufweist.

5. Analysesystem gemäß Anspruch 4, das für eine isothermische Oligonukleotid-Verstärkung angepaßt ist.

6. Analysesystem gemäß Anspruch 4, das für eine PCR-Verstärkung angepaßt ist, wobei das immobilisierte Enzym eine thermophile Desoxyribonukleinsäure- (DNS-) Polymerase mit einer ausreichenden Aktivität ist, um ein DNS-Analyt zu einem für die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation-Laufzeit-Massenspektroskopie erfaßbaren Pegel zu verstärken, wobei das Analysesystem ferner eine Einrichtung zum schnellen zyklischen Durchlaufen der Temperatur der Reaktionszone aufweist, wie es für eine PCR-Verstärkung erforderlich ist, und wobei der Dünnfilmträger (10) ferner eine Abdeckung (14; 72) mit einem Zugangstor (16, 18, 20, 22; 74) aufweist.

7. Analysesystem gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die MALDI-Ionisationsoberfläche (30; 96) in dem Probenvorbereitungsfach enthalten und mit einem Mikrokanal (36; 64) verbunden ist.

8. Analysesystem gemäß Anspruch 7, bei dem die MALDI-Ionisationsoberfläche eine Reaktionszone aufweist.

9. Analysesystem gemäß Anspruch 7, bei dem die MALDI-Ionisationsoberfläche (96) eine Erfassungsregion (98) aufweist.

10. Analysesystem gemäß Anspruch 8 oder 9, bei dem der Verbindungsmikrokanal (64) eine reversible Abdichtungseinrichtung (66) aufweist.

11. Integriertes Nukleinsäureanalysesystem für eine Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation-Laufzeit-Massenspektroskopie (MALDI-TOF-MS) mit folgenden Merkmalen:
einem Dünnfilmträger (10) mit einem Probenvorbereitungsfach, wobei das Fach eine Mehrzahl von Reaktionszonen (60, 78), die durch Mikrokanäle (64) mit Töpfen (70, 76) verbunden sind, eine Erfassungsregion (68) und eine oder mehrere MALDI-Ionisationsoberflächen (62) in dem Fach aufweist, und mit einem Zugangstor (72), das mit mindestens einem Mikrokanal (64) kommuniziert, wobei die Mikrokanäle (64) mit einer Einrichtung zum Richten des Flusses von Reagenzien und Analyten in dem Probenvorbereitungsfach und mit einer Abdichtungseinrichtung (66) versehen sind, und wobei die Töpfe (70, 76) und die Erfassungsregionen (68) optional mit Zugangstoren (72) versehen sind;
einer Einrichtung zum Bewegen des Oligonukleotid-Analyts in dem Fach;
einer Einrichtung zum Automatisieren einer Probenvorbereitung; und
einer Einrichtung zum schnittstellenmäßigen Verbinden des Dünnfilmträgers mit einem Massenspektrometer.

12. Analysesystem gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die MALDI-Ionisationsoberfläche (62) in einem drehbaren Kammgerät (90) vorgesehen ist, wobei das Gerät (90) eine obere Handhabungseinrichtung (92) mit sich nach unten erstreckenden Zähnen aufweist, und wobei das Gerät (90) zu einer ersten und einer zweiten Position drehbar ist, wobei aufgrund einer Drehung des Geräts (90) in eine erste Position die Spitzen der Zähne in Kontakt mit Analyt-enthaltenden Töpfen in dem Probenvorbereitungsfach gebracht werden, wodurch es bewirkt wird, daß das lösliche Analyt, das in demselben enthalten ist, zum Mischen mit einer Matrix und zum Ablegen auf der Ionisationsoberfläche (96) nach oben gezogen wird, und wobei eine Drehung des Geräts (90) in eine zweite Position die Ionisationsoberfläche (96) mit dem Vakuumtor eines Massenspektrometers zum Einführen in dasselbe ausrichtet.

13. Analysesystem gemäß Anspruch 12, bei dem die Kammzähne hohle Röhren mit einem offenem Ende aufweisen, die sich zusammen mit der Kammhandhabungseinrichtung (92) erstrecken, wobei die Kammhandhabungseinrichtung (92) eine MALDI-Ionisationsoberfläche (96) aufweist.

14. Analysesystem gemäß Anspruch 12, bei dem die Kammzähne feste Dochte aufweisen, von denen jeder eine Analyteinfangregion (98) aufweist, wobei die Einfangregion (98) sich zusammen mit der MALDI-Ionisationsoberfläche (96) erstreckt.

15. Integriertes Nukleinsäureanalysesystem für eine Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation-Laufzeit-Massenspektroskopie (MALDI-TOF-MS) mit folgenden Merkmalen:
einem Dünnfilmträger (10) mit einem Probenvorbereitungsfach, wobei das Fach eine Mehrzahl von Reaktionszonen (60, 78), die durch Mikrokanäle (64) mit Töpfen (70, 76) und Einfangregionen (68) in dem Fach verbunden sind, und ein Zugangstor (72) aufweist, das mit mindestens einem Mikrokanal (64) kommuniziert, wobei die Mikrokanäle (64) mit einer Einrichtung zum Richten des Flusses von Reagenzien und Analyten in

dem Probenvorbereitungsfach versehen sind, und wobei die T⁻pfe (70, 76) und Einfangregionen optional mit Zugangstoren (72) versehen sind;

einer Matrix-unterstützte-Laser-Desorption/Ionisation-(MALDI-) Ionisationsoberfläche (96), die in einem drehbaren Kammgerät (90) enthalten ist, wobei das Gerät (90) eine obere Handhabungseinrichtung (92) mit sich nach unten erstreckenden Zähnen aufweist, wobei das Gerät (90) zu einer ersten und einer zweiten Position drehbar ist, wobei eine Drehung des Geräts (90) in eine erste Position die Spitzen der Zähne in Kontakt mit Analyt-enthaltenden Töpfen in dem Probenvorbereitungsfach bringt und bewirkt, daß das lösliche Analyt, das in demselben enthalten ist, zum Mischen mit einer Matrix und zum Ablegen auf die Ionisationsoberfläche (96) nach oben gezogen wird, und wobei eine Drehung des Geräts (90) in eine zweite Position die Ionisationsoberfläche mit dem Vakuumtor eines Massenspektrometers zum Einfügen in dasselbe ausrichtet;

einer Einrichtung zum Bewegen des Oligonukleotid-Analyts in dem Probenvorbereitungsfach;

einer Einrichtung zum Automatisieren einer Probenvorbereitung; und

einer Einrichtung zum schnittstellenmäßigen Verbinden des Dünnfilmträgers (10) mit einem Massenspektrometer.

16. Analysesystem gemäß Anspruch 15, bei dem die Kammzähne hohle Röhren mit offenem Ende aufweisen, die sich zusammen mit der Kammhandhabungseinrichtung (92) erstrecken, wobei die Kammhandhabungseinrichtung (92) eine MALDI-Ionisationsoberfläche (96) aufweist.

17. Analysesystem gemäß Anspruch 15, bei dem die Kammzähne feste Döchte aufweisen, wobei jeder der Döchte eine MALDI-Ionisationsoberfläche (96) aufweist, und wobei die Ionisationsoberfläche (96) ferner eine Einfangregion (98) aufweist.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

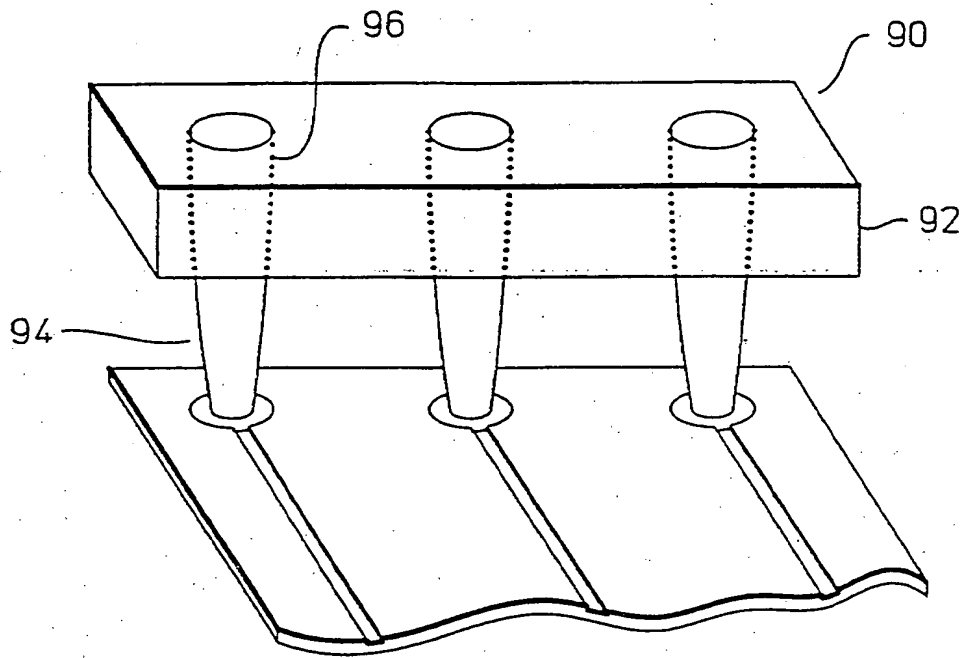


FIG. 4A

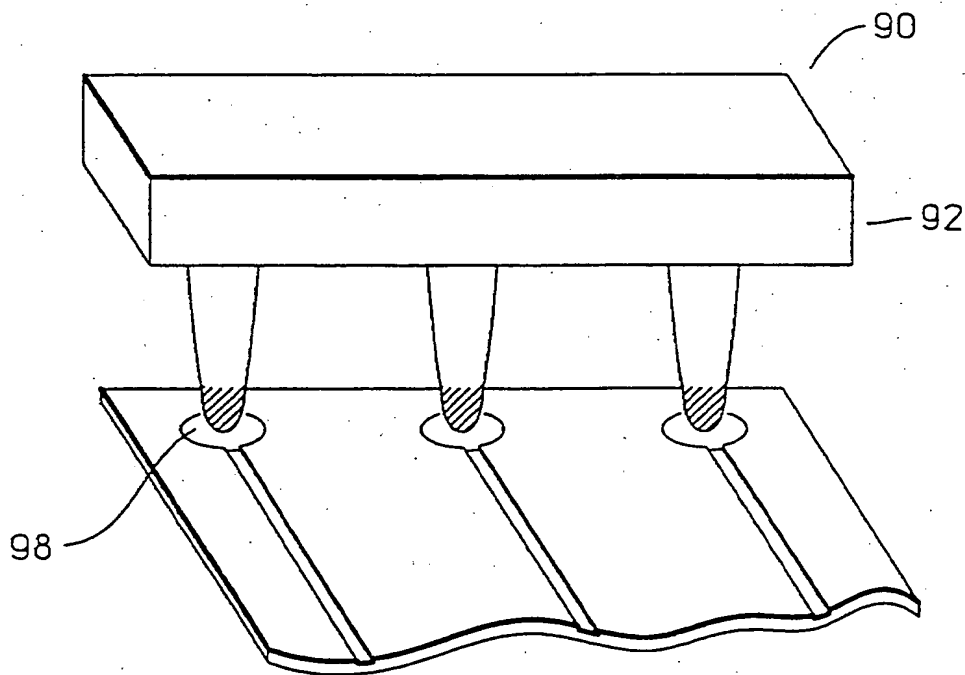


FIG. 4B

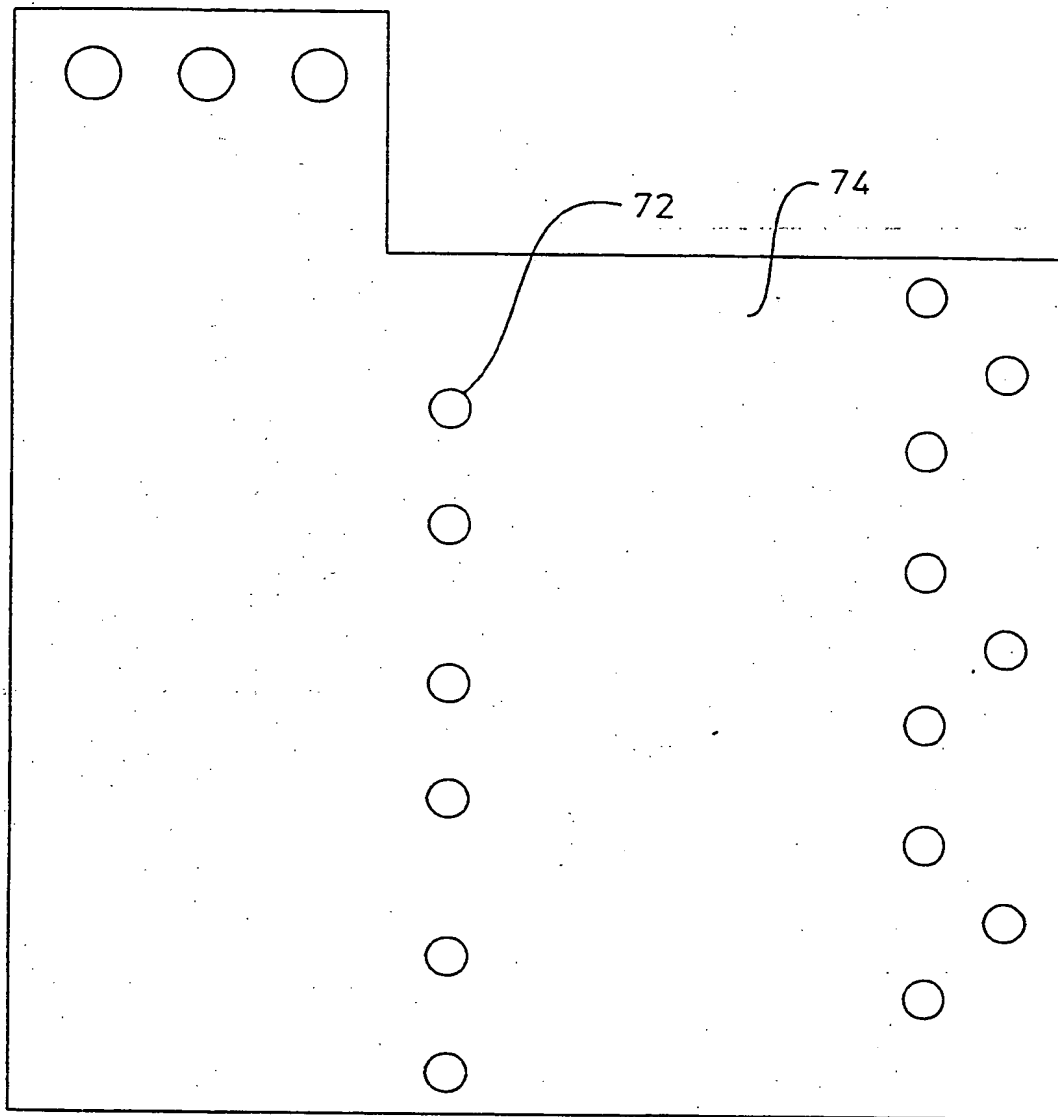


FIG. 3B

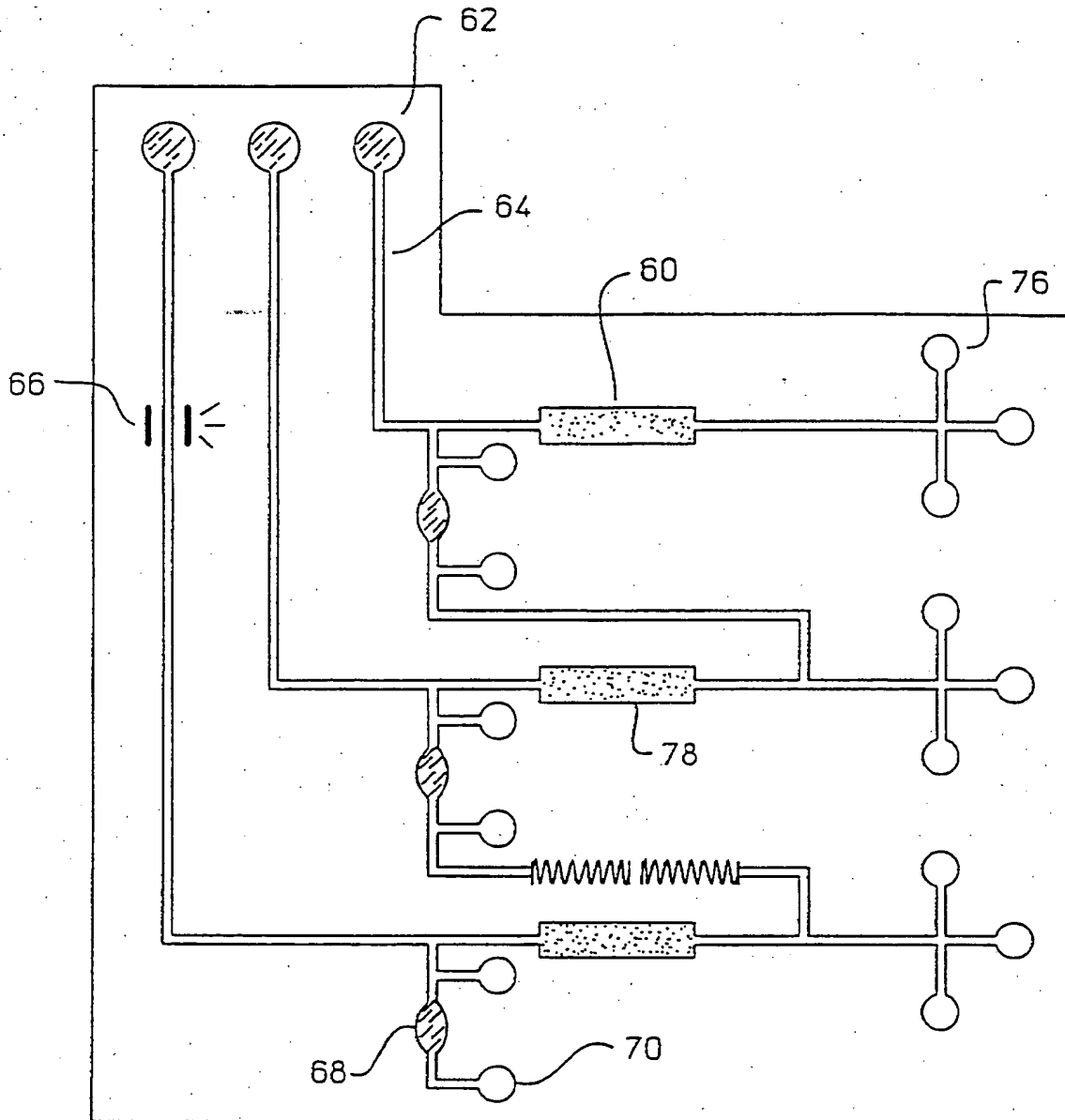


FIG. 3A

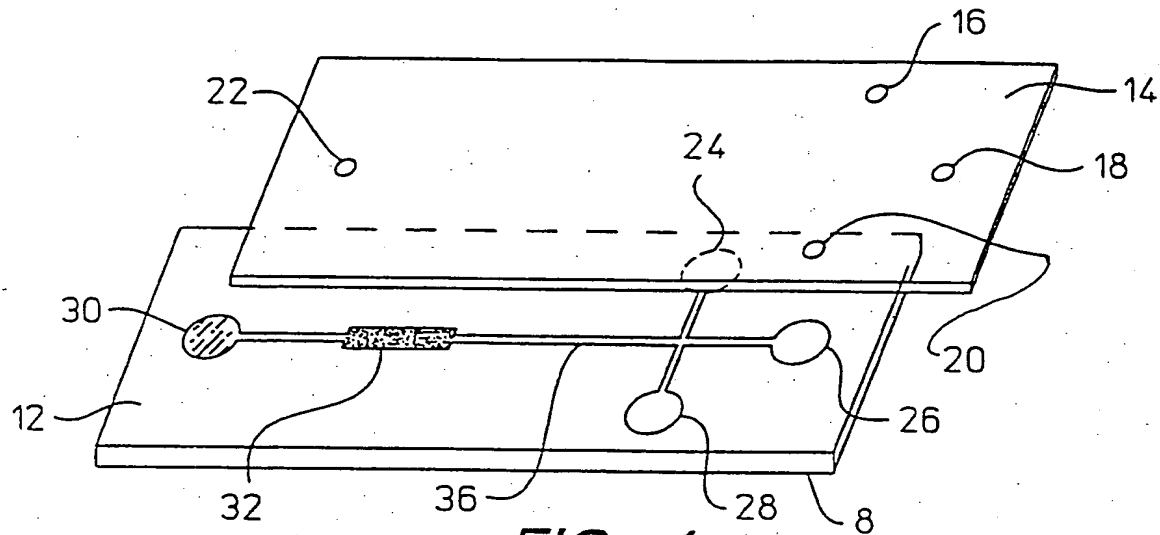


FIG. 1

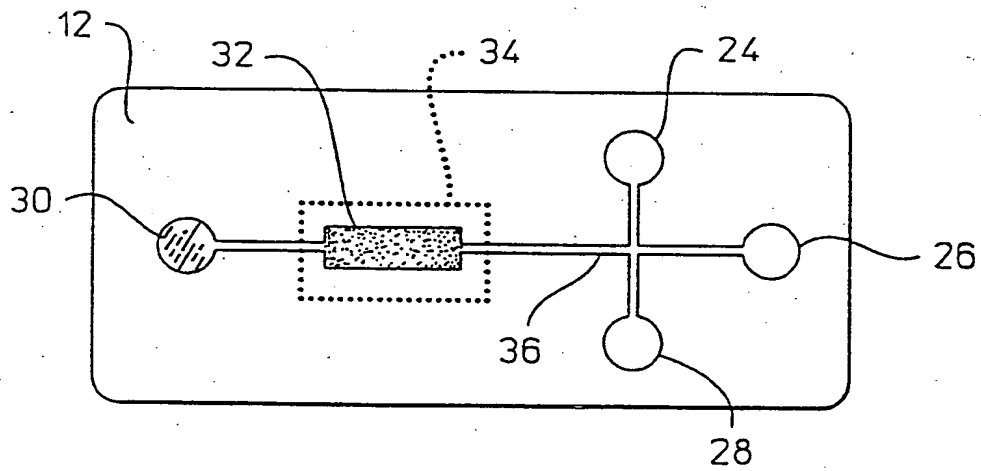


FIG. 2A

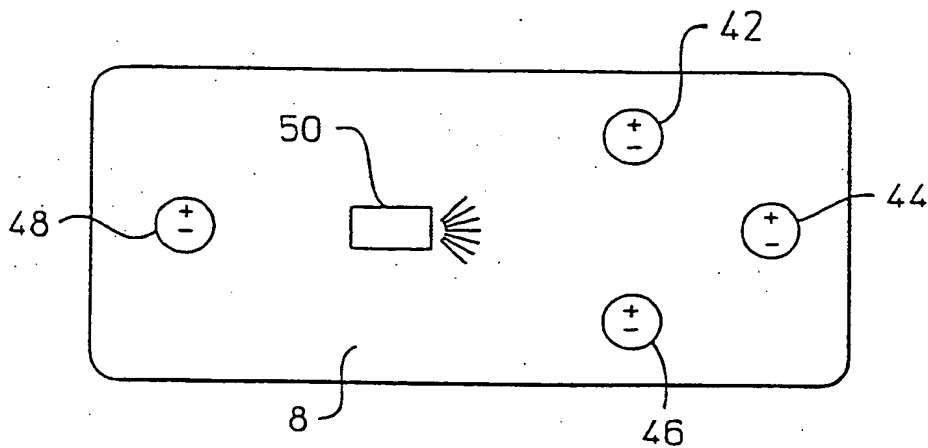


FIG. 2B